



Studies on the molecular mechanisms of skin pigmentation

著者	丸橋 総史郎
号	17
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第395号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00127801

東北大学第64号

博士論文内容の要旨及び 審査結果の要旨

生命科学第17集（課程博士）

（令和元年度授与）

東 北 大 学

令 和 元 年 度

氏名	まるばし そうじろう
学 位 の 種 類	丸橋 総史郎
学 位 記 番 号	博士（生命科学）
学位授与年月日	生博第395号
学位授与の要件	令和2年3月25日
研 究 科 , 専 攻	学位規則第4条第1項該当
論 文 題 目	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
	Studies on the molecular mechanisms of skin pigmentation(皮膚暗色化に関する分子メカニズムの研究)
博士論文審査委員	(主査) 教授 福田 光則 教授 田口 友彦 准教授 安元 研一

論文内容の要旨

【背景】

メラノソームはメラニン色素を合成・貯蔵する特殊な細胞小器官であり、私たちの皮膚に存在するメラノサイトにおいて産生される。黒色に成熟したメラノソームはメラノサイト内を輸送され、デンドライトと呼ばれる突起状構造を介して、接触している周囲のケラチノサイトへと受け渡される。このメラノソームの受け渡しは肌の暗色化を引き起こすだけでなく、紫外線を吸収することで細胞核へのダメージを防ぐ重要な働きを担っている。近年の研究により、メラノサイトにおいては、メラノソームの産生や輸送に関与するタンパク質とその機能が明らかになってきたが、それらのタンパク質の機能を制御する分子メカニズムに関してはほとんどわかっていない。また、ケラチノサイトにおいては、取り込んだメラノソームの輸送、核周辺での蓄積や分解に関与するタンパク質がほとんど同定されていなかった。そこで私は、これら未同定の制御因子に着目し、メラノソームによる皮膚暗色化の分子メカニズムの解明を試みた。

本研究では「(第一部) メラノサイトにおける **Varp** の分解制御機構」と「(第二部) ケラチノサイトにおけるメラノソーム分解機構」の解明を目的に研究を行った(図1)。

【メラノサイトにおける **Varp** の分解制御機構の解析】

これまでの研究で、メラノソームの成熟過程に関与する重要な因子の一つとして、**Varp** が同定されている。メラノサイトにおいて、**Varp** は(1) メラニン合成酵素をメラノソームへと輸送する、(2) デンドライト伸長を促進するという二つの役割を担っている。さらに、**Rab40C** と結合することにより自身がポリユビキチン化され、分解されることが示唆されている。**Varp** が正常に機能するためには、分解によって細胞内のタンパク質量が一定に保たれることが重要と考えられるが、その分解制御に関する分子機構はこれまで全く解明されていなかった。

本研究では、**Varp** の分解機構を制御している結合タンパク質があるのではないかと推測し、まず **Varp** 結合タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、**RACK1** という分子を新規 **Varp** 結合タンパク質として同定することに成功した。次に、特異的な **siRNA** を用いて内在性の **RACK1** のノックダウンを行ったところ、**Varp** タンパク質量の減少と、デンドライト伸長の抑制が観察された。さらに、競合的結合実験を行ったところ、**RACK1** が **Varp** と **Rab40C** の結合を阻害することが示された。以上の結果から、**RACK1** は **Rab40C** と競合的に働くことで **Varp** を安定化させ、デンドライト伸長を促進する機能を有することが明らかとなった。

【ケラチノサイトにおけるメラノソーム分解機構の解析】

ケラチノサイトに取り込まれたメラノソームは、膜状の構造に包まれており、この中でメラノソームタンパク質は分解を受ける。これまでの研究で、この構造上には

LAMP1 などいくつかのタンパク質が存在することは知られていたが、この構造を特徴付けるマーカータンパク質は見つかっておらず、また、メラノソームの分解を評価する手法も確立されていなかった。

本研究では、まずケラチノサイトに取り込まれたメラノソームが存在する区画を詳細に解析するため、Rab ファミリータンパク質 (Rab1~45) の網羅的局在スクリーニングを行った。その結果、11 種類の Rab がケラチノサイトに取り込まれたメラノソームの周りに集積することが確認された。次に、ケラチノサイトに取り込まれたメラノソームのタンパク質の分解を評価するアッセイ系を新たに開発し、11 種の候補 Rab に対して、メラノソーム分解への関与の評価を行った。その結果、Rab7B (Rab42 と呼ばれる) の欠損により、メラノソームタンパク質の分解能が低下することが明らかとなった。以上の結果から、ケラチノサイトにおいて Rab7B/42 がメラノソームを含む区画に集積し、メラノソームのタンパク質分解を促進することが明らかとなった。

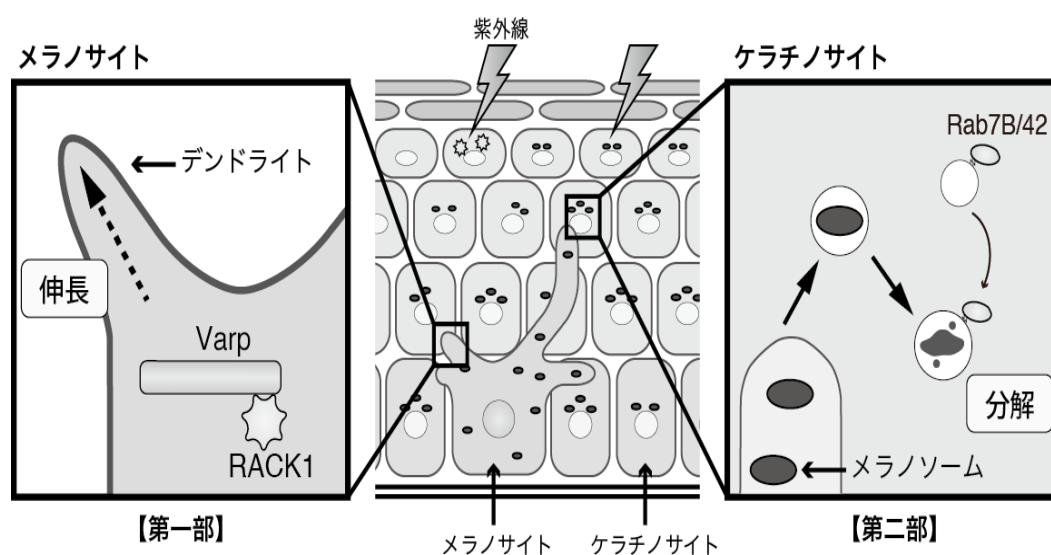


図1 皮膚の構造と本研究の概要図

【発表論文】

1. **Marubashi, S.** et al. (2016) A Varp-binding protein, RACK1, regulates dendrite outgrowth through stabilization of Varp protein in mouse melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1672-1680
2. **Marubashi, S.** et al (2016) RUTBC1 functions as a GTPase-activating protein for Rab32/38 and regulates melanogenic enzyme trafficking in melanocytes. *J. Biol. Chem.* 291, 1427-1440
3. **Marubashi, S.** & Fukuda, M. (2019) Rab7B/42 is functionally involved in protein degradation on melanosomes in keratinocytes. Submitted

論文審査結果の要旨

メラノソームはメラニン色素を合成・貯蔵する特殊なオルガネラで、哺乳類の皮膚においてはメラノサイトでのみ形成される。メラノサイトはデンドライトと呼ばれる突起状構造を伸ばし、隣接するケラチノサイトにメラノソームを受け渡し、その後メラノソームがケラチノサイト内で代謝されることによって皮膚の暗色化が起これと考えられている。しかし、デンドライトの形成制御やケラチノサイト内でのメラノソームの蛋白質分解の仕組みに関しては、これまで不明な点が多かった。

本論文ではまず、デンドライトの形成やメラニン合成酵素の輸送に重要な Varp が、Rab40C の結合依存的にプロテアソーム分解を受けることに着目し、ANKR2 ドメインに結合する新規因子のスクリーニングを行った。その結果、同定された RACK1 という分子は、Rab40C と同様に ANKR2 ドメインに特異的に結合し、*in vitro* で Rab40C と Varp の結合を阻害する作用があることを突き止めた。また、RACK1 をノックダウンすると、内在性の Varp の蛋白質量が減少し、デンドライトの伸長が阻害されることが明らかになった。これらの結果から、RACK1 は Rab40C と競合的に働くことで Varp を安定化させ、デンドライト伸長を促進することが示唆された。

次に、ケラチノサイト内に取り込まれたメラノソームがどのような区画に存在するのかを明らかにするため、小胞輸送の普遍的制御因子である Rab (Rab1-45) ファミリー蛋白質をオルガネラマーカーとして用い、網羅的な局在スクリーニングを行った。さらに、メラノソームの蛋白質の分解を評価する新たなアッセイ系を開発し、メラノソームに集積することが明らかになった 11 種類の Rab を対象に、メラノソーム分解への関与を検討した。その結果、Rab7B の欠損によりメラノソーム蛋白質の分解能が著しく低下することを突き止めた。以上の結果から、ケラチノサイトにおいて Rab7B がメラノソームを含む区画に集積し、メラノソームの蛋白質分解を促進することが明らかになった。

以上のように、丸橋氏は当該研究分野において卓越した研究成果を挙げており、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有するものと判断できる。したがって、丸橋総史郎氏の提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。